

KERAGAMAN DURIAN BERDASARKAN FRAGMEN *INTERNAL TRANSCRIBED SPACERS* (ITS) DNA RIBOSOMAL MELALUI ANALISIS PCR-RFLP

RU Hikmah ✉ A Retnoningsih, NA Habibah

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:

Diterima Februari 2016

Disetujui Maret 2016

Dipublikasikan April 2016

Keywords:

Durian; PCR-RFLP; Internal Transcribed Spacers (ITS)

Abstrak

Durian adalah salah satu jenis buah-buahan tropis yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Durian memiliki bermacam-macam kultivar dengan morfologi yang sulit untuk dibedakan. Jaminan identitas penting untuk informasi mendasar dalam meningkatkan efisiensi pemuliaan dan pengembangan durian. Identifikasi molekuler dianggap lebih akurat dibandingkan dengan karakter morfologi. *Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) adalah metode untuk menganalisis hasil DNA fragmen panjang perbedaan yang mencerna menggunakan enzim restriksi dengan endonuklease. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah aksesori yang durian diambil secara acak dikecamatan Gunungpati, Semarang. Genomi DNA diisolasi berdasarkan protokol Kit nukleon Phytopure dengan modifikasi. ITS wilayah ribosom DNA diamplifikasi menggunakan teknik PCR-RFLP mengeksploitasi primer spesifik L ITS dan ITS 4 menghasilkan ITS panjang fragmen pada 800 bp. Amplikon yang dicerna menggunakan enam enzim restriksi AluI, Eco471, Bsp1431, BsuRI, Mph11301 dan Ade1. Hasil penelitian dari 11 aksesori durian yang diperiksa menunjukkan bahwa enzim Bsp1431 memiliki dua situs tertentu yang dipotong pada ukuran 550 bp dan 120 bp. enzim BsuRI memiliki satu situs tertentu dalam ukuran 600 bp. Sedangkan enzim Eco471 telah mencerna situs spesifik pada ukuran 450 bp. Kesimpulan dari penelitian ini adalah durian nomor aksesori ke-12, 15, dan 17 memiliki hubungan genetik dekat dan diduga berada di salah satu spesies.

Abstract

Durian is one of the types of tropical fruits that has high economic value. Durian has an assortment of cultivars with morphology that are difficult to distinguish. Identity assurance is important for the fundamental information in increasing the efficiency of breeding and development of durian. Molecular identification is considered to be more accurate than the morphological characters. Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) is a method to analyze the results of DNA fragment length difference that digest using restriction enzyme with endonuclease. The sample used in this study was the accession of durian taken randomly in Gunungpati district, Semarang. Genomic DNA was isolated based on Nucleon Phytopure Kit protocol with modification. ITS DNA ribosomal region was amplified using PCR-RFLP technique exploiting specific primers ITS L and ITS 4 produce ITS fragment length at 800 bp. Amplicon was digested using six restriction enzyme AluI, Eco471, Bsp1431, BsuRI, Mph11301 and Ade1. The research result of 11 accessions durian which is examined shows that the Bsp1431 enzyme has two specific sites that is cut on the size 550 bp and 120 bp. BsuRI enzymes have a specific site cuts in the size of 600 bp. Whereas Eco471 enzyme has digesting sites specifics on size 450 bp. The conclusion of this research is durian accession number 12th, 15th, and 17th have close genetic relation and are alleged to be in one species.

© 2016 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:
Kampus Sekaran Gunungpati Semarang 50229

PENDAHULUAN

Buah durian merupakan salah satu jenis buah-buahan tropis yang mempunyai nilai ekonomis tinggi. Indonesia merupakan salah satu negara penghasil buah durian yang memiliki keanekaragaman. Salah satu daerah penghasil durian di Indonesia yaitu Kecamatan Gunungpati, Semarang, Jawa Tengah. Buah durian memiliki bermacam-macam kultivar dengan ciri morfologi yang sulit dibedakan. Kepastian identitas kultivar durian menjadi sangat penting untuk menghindari kekeliruan khususnya dalam budidaya dengan tujuan komersial dan sebagai informasi mendasar dalam peningkatan efisiensi dan pengembangan pemuliaan durian.

Keanekaragaman genetika menggunakan penanda morfologi hasilnya kurang tepat karena sangat dipengaruhi oleh lingkungan dan interaksi antar genetik (Pandin 2010; Sobir *et al.* 2005). Hal ini diperkuat dengan hasil penelitian Novayandi (2004) bahwa ada ketidaksesuaian karakter morfologi dengan penanda isozim. Penggunaan karakter molekuler sebagai sarana identifikasi dipandang lebih akurat dibandingkan karakter morfologi (Guzwo-Krzeminska *et al.* 2001; Vicente *et al.* 2005). Salah satu karakter molekuler yang digunakan sebagai karakter pengenal adalah daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) DNA ribosom. Pada daerah tersebut dilakukan analisis menggunakan metode *Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Metode ini merupakan salah satu metode penandaan DNA didasarkan pada perbedaan situs pemotongan. Pemotongan dilakukan dengan enzim restriksi endonuklease yang dapat mendigesti DNA dan memotong DNA pada situs restriksi tertentu menjadi fragmen-fragmen. Pemanfaatan PCR-RFLP dalam identifikasi tanaman banyak dilakukan, antara lain pada *Phaseolus* (Vekemas *et al.* 1997) dan pisang (Ekasari 2011). Metode PCR-RFLP juga telah digunakan untuk mempelajari variasi genetik 11 aksesori dari 10 spesies durian menggunakan delapan jenis enzim restriksi (Santoso *et al.* 2005).

Berdasarkan uraian di atas, permasalahan yang dikaji dalam penelitian ini adalah mengetahui kekerabatan aksesori durian menggunakan metode PCR-RFLP berdasarkan ukuran fragmen spesifik *Internal Transcribed Spacer* (ITS) DNA ribosomal.

METODE

Sampel daun durian diambil dari Kecamatan Gunungpati Kotamadya Semarang berjumlah 11 aksesori. Isolasi DNA durian dilakukan di Laboratorium Genetika dan Biologi Molekuler Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang. DNA diisolasi menggunakan Kit Isolasi DNA (*Nucleon Phytopure*, USA) dengan prosedur kerja mengikuti protokol dari *Nucleon Phytopure* yang telah dimodifikasi dengan penambahan β -merkaptotanol dan RNAase.

Amplifikasi daerah ITS DNA ribosom dilakukan dengan mencampurkan 10 ng DNA template, masing-masing 0,5 μ l primer ITS L (5'TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGG3') dan ITS 4 (5'TCCTCCGCTTATTG ATATGC3') kemudian ditambah 200 μ l dNTP mix, 5 μ l PCR buffer 10X dan 0,24 μ l enzim *taq polymerase*. Rangkaian proses amplifikasi DNA target diawali tahap denaturasi DNA menjadi untai tunggal pada suhu pre-denaturasi 95°C selama 1 menit. Selanjutnya amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus yang meliputi denaturasi pada 95°C selama 1 menit, diikuti *annealing* pada suhu 45°C selama 30 detik, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit. Amplifikasi diakhiri dengan tahap ekstensi pada suhu 72°C selama 7 menit. ITS DNA ribosomal hasil amplifikasi selanjutnya dipotong menggunakan enam restriksi *Alu1*, *Bsp1431*, *BsuR1*, *Eco471*, *Ade1* dan *Mph11301*.

Hasil pemotongan dengan enzim restriksi kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose 2%. Data filogeni dianalisis menggunakan program NTSYS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang telah terkumpul dilakukan proses isolasi untuk mendapatkan DNA. Proses isolasi sangat menentukan kualitas DNA target yang digunakan sebagai template awal. DNA hasil isolasi untuk dapat diamplifikasi harus memiliki kualitas yang bagus, yaitu tidak *smear*, tidak terpotong-potong dan tidak mengandung zat lain. Indikasinya terlihat saat pita DNA dalam elektroforegram menunjukkan pita yang kompak dan tidak *smear*. *Smear* merupakan DNA yang

terpotong-potong dan berukuran kecil. Kesulitan dalam mengisolasi DNA durian yaitu ada banyak lendir yang dihasilkan dan warna kecoklatan pada pelet hasil isolasi DNA. Lendir dihasilkan terutama pada daun durian yang muda dan DNA hasil isolasi sedikit. Lendir dapat diatasi dengan menggunakan daun dewasa pada tanaman, hal ini telah dilakukan oleh Small *et al.* (2004).

Warna kecoklatan pada pelet DNA durian juga terjadi pada pelet hasil isolasi DNA daun mulberi. Adanya warna kecoklatan pada pelet DNA daun mulberi menyebabkan DNA sulit diisolasi. Untuk mengatasinya, Anuradha *et al.* (2013) menambahkan *polyvinil pirrolidone* (PVP), asam askorbat, *diethyldithiocarbamic acid* (DIECA), *sodium metabisulfite* dan *sodium dodecyl sulphate* pada buffer isolasi CTAB. DIECA adalah *phenoloxidase inhibitor* yang membantu mengurangi warna kecoklatan akibat oksidasi polifenol quinon. Penambahan asam L-askorbat mencegah oksidasi senyawa fenolik dan adsorpsi dengan molekul DNA. PVP juga memiliki fungsi yang sama, membentuk kompleks senyawa ikatan hidrogen dengan senyawa fenolik presipitat bersama dengan sel sehingga mencegah polifenol berinteraksi dengan DNA.

Proses isolasi DNA telah dilakukan dengan menggunakan beberapa metode isolasi yaitu metode Dixit (1998), metode Rath *et al.* (1998), metode Dharma *et al.* (2005), metode Doyle & Doyle (1990), metode Porebski *et al.* (1997) dan metode Orozco-Castillo *et al.* (1994). Namun hasil pelet yang diperoleh berwarna coklat dan tidak larut dalam buffer *Tris-EDTA* (TE) atau berlendir. Hasil elektroforesis menunjukkan kualitas pita DNA masih terdapat *smear* dan tidak memberikan hasil yang baik untuk dilakukan PCR.

Proses isolasi selanjutnya menggunakan Kit Isolasi DNA *Nucleon Phytopure* dengan berbagai optimasi isolasi yaitu 1) perbandingan menggunakan daun segar, 2) penambahan jumlah jaringan daun yang akan diekstrak, 3) penambahan β -merkaptotanol dan RNAase (Anonim 2007). Kombinasi kit dan perlakuan tersebut menghasilkan pelet DNA genom yang baik (Gambar 1).



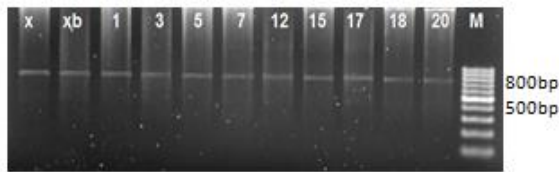
Gambar 1. Elektroforegram DNA genom pada gel agaros 0.8 %

Optimasi isolasi DNA durian dalam penelitian ini dilakukan menggunakan beberapa cara yaitu optimasi penambahan atau pengurangan jumlah jaringan yang akan diisolasi, penambahan β -merkaptotanol, dan penambahan RNAse selama proses isolasi dan purifikasi DNA. Menurut Moyo *et al.* (2008) optimasi jumlah jaringan tanaman per satuan volume buffer ekstraksi adalah salah satu faktor yang paling kritis dalam prosedur isolasi DNA tanaman. Di sisi lain, daun durian merupakan jaringan aktif fotosintesis yang mengandung senyawa polifenol. Ketika proses penggerusan, senyawa ini berinteraksi secara ireversibel dengan protein dan asam nukleat sehingga membentuk lendir (*gelatinous matrix*) (Michiels *et al.* 2003). Lendir ini menghambat proses PCR, jika tidak dihilangkan. Penambahan β -Merkaptotanol berfungsi untuk mencegah terjadinya oksidasi senyawa polifenol selama proses isolasi DNA (Kawata *et al.* 2003). Penelitian Suman *et al.* (1999) menyebutkan bahwa tingkat β -merkaptotanol yang tinggi berhasil menghilangkan polifenol. Oleh karena itu, konsentrasi β -merkaptotanol yang tinggi merupakan protokol yang baik untuk menghasilkan DNA berkualitas baik dari spesies tanaman yang mengandung polifenol.

Dalam penelitian ini, konsentrasi NaCl yang tinggi digunakan untuk menghapus kadar polisakarida selama ekstraksi DNA. Hameed *et al.* (2004) pada penelitiannya juga melaporkan bahwa kualitas DNA hasil isolasi gandum menjadi bagus setelah meningkatkan kadar NaCl dan β -merkaptotanol dalam buffer isolasi. Kemurnian DNA gandum hasil isolasi sangat baik yaitu pada rasio A260/A280 dan A260/A230 adalah 1,79-1,94 dan > 2 yang menunjukkan bahwa DNA bebas dari protein dan polifenol serta senyawa polisakarida.

DNA genom hasil isolasi diamplifikasi menggunakan ITS L dan ITS 4. Hasil amplifikasi

tersebut dielektroforesis menggunakan gel agarose 1 % (Gambar 2). Elektroforegram berdasarkan



Gambar 2. Elektroforegram Amplifikasi Menggunakan ITS L dan ITS 4. M : DNA marker 100 bp, x,xb,1-dst : aksesori durian

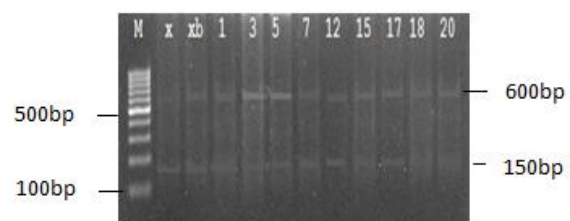
Amplifikasi DNA secara *in vitro* dilakukan menggunakan proses sintesis enzimatis dikenal dengan nama PCR. Proses amplifikasi oleh PCR dipengaruhi oleh berbagai parameter antara lain (1) kualitas dan konsentrasi DNA *template*, (2) desain dan konsentrasi primer, (3) konsentrasi ion magnesium, (4) konsentrasi empat deoksiribonukleotida (dNTP), (5) buffer PCR, (6) konsentrasi *Taq* polimerase, (7) siklus PCR, (8) penggunaan teknik *hotstart*. Namun, tidak ada satu protokol PCR yang optimal untuk semua genom. Oleh karena itu, masing-masing PCR memerlukan optimasi khusus, terutama optimasi *template* dan primer yang akan digunakan (Grunenwald 2003). Hal tersebut juga disebutkan oleh Aris (2011) bahwa keberhasilan amplifikasi lebih didasarkan kepada kesesuaian primer serta efisiensi dan optimasi proses PCR. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Optimasi PCR diperlukan untuk menghasilkan karakter yang diinginkan, yaitu optimasi suhu *annealing* DNA dalam mesin PCR. Optimasi suhu *annealing* menjadi bagian yang paling penting dalam proses amplifikasi (Roux 2003).

Suhu *annealing* yang terlalu rendah dan terlalu tinggi menyebabkan primer tidak dapat melekat pada tempat yang spesifik sehingga hasil amplifikasi DNA target tidak didapatkan. Pada amplifikasi DNA pisang, suhu *annealing* yang optimal yaitu suhu 48°C. Pada penelitian ini, optimasi suhu *annealing* dilakukan menggunakan dua cara yaitu pada suhu 48°C (Ekasari 2011) dan *gradient* suhu yaitu pada suhu 38°C, 39°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, dan 46°C.

marker 100bp menunjukkan hasil amplifikasi daerah ITS DNA ribosomal berukuran 800bp.

Hasil amplifikasi terbaik daerah ITS DNA ribosomal pada 11 aksesori durian dalam penelitian ini terjadi pada suhu *annealing* 45°C. Daerah ITS dapat diamplifikasi pada seluruh tanaman hijau menggunakan primer yang sama (Baldwin *et al.* 1995), sehingga daerah ITS dari DNA hasil ekstraksi dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies. Daerah ITS yang dianalisis pada penelitian pohon baobab (*Adansonia sp*) yang merupakan salah satu kerabat durian (*Bombaceae*) sepanjang 787 bp. Sekuen individu memiliki panjang antara 771-772 bp (Baum *et al.* 1998). Filogeni ITS menunjukkan bahwa *Adansonia digitata* dan *Adansonia kilima* secara genetik sama yaitu menunjukkan tetraploid yang berevolusi (Pettigrew *et al.* 2012).

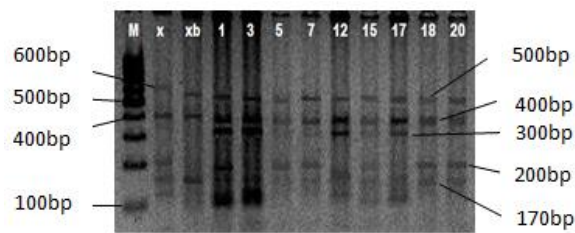
Penelitian ini menggunakan enam jenis enzim restriksi yang memotong daerah ITS, yaitu *Alu1*, *Bsp1431*, *BsuR1*, *Eco471*, *Ade1* dan *Mph11301*. Empat enzim menunjukkan hasil pemotongan, sedangkan dua enzim tidak. Keempat enzim tersebut adalah *Alu1*, *Bsp1431*, *BsuR1*, dan *Eco471* dan enzim yang tidak menunjukkan pemotongan adalah *Ade1* dan *Mph11301*. Enzim *Alu1* memotong DNA menjadi dua fragmen pada seluruh aksesori yaitu dengan ukuran 600 bp dan 150 bp (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa enzim *Alu1* tidak memiliki situs yang spesifik pada daerah ITS aksesori durian yang diteliti.



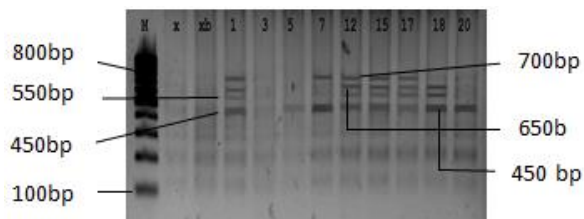
Gambar 3. Elektroforegram hasil pemotongan menggunakan enzim restriksi *Alu1*. M : DNA marker 100 bp, x,xb,1-dst : aksesori durian

Enzim *Bsp1431* memiliki situs pemotongan yang spesifik pada ukuran 550 bp dan 130 bp. Ukuran pita 550 bp yaitu hanya pada aksesori nomor xb dan ukuran pita 130 bp hanya ada pada aksesori nomor x. Hal ini menunjukkan bahwa enzim *Bsp1431* memiliki situs pemotongan spesifik pada ukuran 550 bp dan 130 bp. Pemotongan oleh

enzim *Bsp1431* memiliki 7 variasi ukuran pada

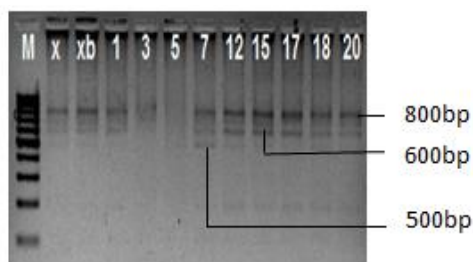


Gambar 4. Elektrogoregram hasil pemotongan menggunakan enzim *Bsp1431*. M : DNA marker 100 bp, x,xb,1-dst : aksesori durian



Gambar 5. Elektroforegram hasil pemotongan menggunakan enzim *BsuR1*. M : DNA marker 100 bp, x,xb,1-dst: aksesori durian

Pemotongan oleh enzim *Eco471* terdapat tiga variasi ukuran pemotongan (Gambar 6). Aksesori nomor x, xb dan 1 memiliki ukuran pita 800 bp. Aksesori nomor 3 dan 5 tidak menunjukkan adanya DNA. Aksesori nomor 7 memiliki ukuran pita DNA 800 bp, 600 bp dan 450 bp. Aksesori nomor 12, 15 dan 17 memiliki ukuran pita DNA yaitu 800 bp dan 600 bp. Aksesori nomor 18 dan 20 memiliki ukuran 800 bp, dan smear pada ukuran 600 bp dan 500 bp.

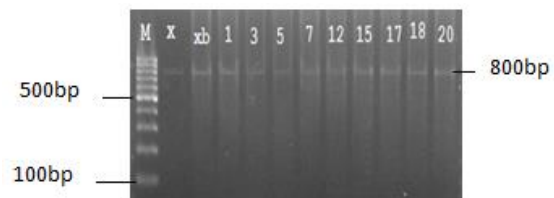


Gambar 6. Elektroforegram hasil pemotongan menggunakan enzim *Eco471*. M : DNA marker 100 bp, x,xb,1-dst : aksesori durian

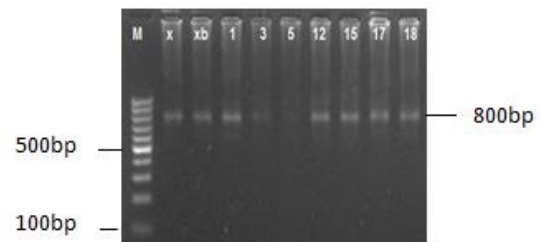
Inkubasi menggunakan enzim *Ade1* (Gambar 7) dan *Mph11031* (Gambar 8) menunjukkan tidak

kesebelas aksesori durian yang diteliti (Gambar 4).

Enzim *BsuR1* memiliki 6 variasi ukuran pemotongan (Gambar 5). Hasil pemotongan menggunakan enzim *BsuR1* beberapa aksesori nampak hanya *smear* yaitu pada aksesori nomor x, xb dan 3. Aksesori nomor 1 memiliki ukuran pita 700 bp, 600 bp dan 450 bp. Aksesori nomor 5 terpotong pada ukuran 450 bp. Aksesori nomor 7 memiliki ukuran pita DNA 700 bp dan 450 bp. Aksesori nomor 12, 15 dan 17 memiliki ukuran pita DNA yaitu 700 bp, 650 bp, 550 bp dan 450 bp. Aksesori nomor 18 memiliki ukuran 650 bp, 550 bp, dan 450 bp. Aksesori nomor 20 memiliki ukuran 450bp. terjadi pemotongan, hal ini menunjukkan bahwa enzim tersebut tidak memiliki situs pemotongan yang pada daerah ITS DNA Ribosomal kesebelas aksesori durian.



Gambar 7. Elektroforegram hasil pemotongan menggunakan enzim restriksi *Ade1*. M: DNA marker 100 bp, x,xb,1-dst : aksesori durian

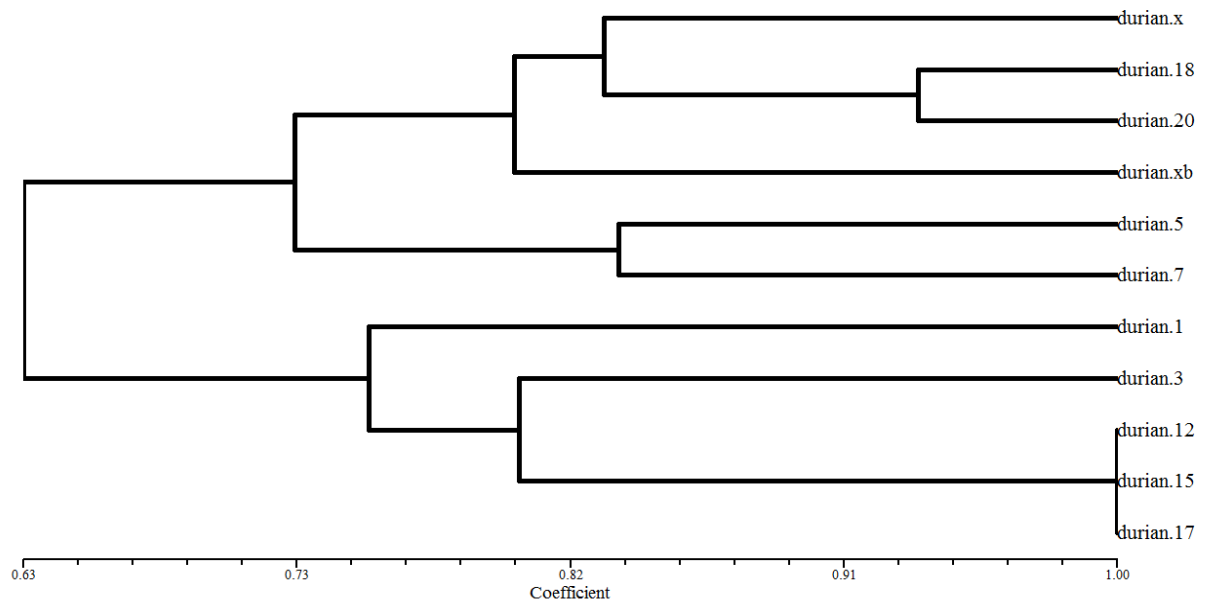


Gambar 8. Elektroforegram hasil pemotongan menggunakan enzim *Mph11301*. M : DNA marker 100 bp, x,xb,1-dst aksesori durian

Data hasil pemotongan dengan menggunakan enam enzim tersebut dapat dibuat dalam bentuk tabel untuk mempermudah dalam tahap berikutnya (Tabel 1). Penyajian ini akan dapat digunakan untuk analisis pembuatan dendrogram hubungan kekerabatan pada 11 aksesori tanaman durian (Gambar 9).

Tabel 1. Ukuran Fragmen DNA Hasil Pemotongan Menggunakan Enzim *Alu1*, *Bsp1431*, *BsuR1*, *Eco471*, *Ade1*, dan *Mph11301*

Ukuran fragmen DNA (bp)	Kode Aksesori Durian										
	x	xb	1	3	5	7	12	15	17	18	20
100											
130	√										
150	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
170	√	√	√							√	√
200	√				√	√				√	√
250			√								
300				√			√	√	√		
350											
400	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
450			√		√		√	√	√		
500			√	√	√	√	√	√	√	√	√
550		√								√	
600	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
650							√	√	√		
700							√	√	√		
800	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√



Gambar 9. Dendrogram aksesori durian

Hubungan kekerabatan 11 aksesori durian berdasarkan pita ITS DNA ribosomal menghasilkan dendrogram dengan nilai koefisien kemiripan antara 0,63-1,00 (Gambar 9). Semakin besar nilai koefisien kemiripan, maka semakin dekat hubungan kekerabatan antar aksesori. Dua *cluster*

besar aksesori durian menunjukkan kedekatan kekerabatan antara 6 aksesori durian dan kekerabatan antara 5 aksesori durian. *Cluster* pertama dibagi menjadi dua sub *cluster*, yaitu sub *cluster* yang pertama dibagi menjadi dua sub grup yang menunjukkan kedekatan kekerabatan aksesori

durian x, durian xb, durian 18, dan durian 20. Sub *cluster* yang kedua, menunjukkan kedekatan kekerabatan aksesori durian 5 dan durian 7. Selanjutnya, *cluster* kedua dibagi menjadi dua sub *cluster*. Sub *cluster* yang pertama dalam *cluster* kedua, adalah aksesori durian 1. Sub *cluster* yang kedua terdiri atas dua sub grup yang menunjukkan aksesori durian 3, durian 12, durian 15 dan durian 17 memiliki kekerabatan yang dekat. Mengacu pada dua sub *cluster* di dalam *cluster* kedua, aksesori durian 12, durian 15, dan durian 17 memiliki kekerabatan paling dekat. Hasil analisis kekerabatan berdasarkan dendrogram ini dapat diperkuat dengan data analisis keanekaragaman berdasarkan karakteristik taksonomi, yaitu bentuk buah, ukuran duri pada kulit buah, dan morfologi daun (Somsri 2007).

Penentuan genom menggunakan metode PCR-RFLP pada daerah ITS DNA ribosomal lebih sederhana dan lebih mudah dilakukan, hal ini karena primer yang digunakan bersifat universal, sehingga amplifikasi yang dilakukan lebih mudah dan efisien. Penelitian ini merupakan studi awal, sehingga diperlukan analisis lebih lanjut untuk mengetahui nama spesies masing-masing aksesori durian. *Database* nama spesies durian berdasarkan analisis PCR-RFLP dapat digunakan sebagai acuan untuk mengklasifikasi spesies durian. Urutan basa hasil sekuensing dapat dilacak untuk memperoleh nama spesies berdasarkan *database* yang ada di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Sekuens DNA hasil PCR-RFLP dilacak untuk mengetahui persentase kemiripan dan homologi menggunakan BLAST. Spesies yang memiliki nilai *max score* dan *max identity* tertinggi di dalam *database* BLAST adalah spesies yang paling dekat kekerabatannya dengan sampel yang dianalisis.

SIMPULAN

DNA genom 11 aksesori durian berhasil diamplifikasi menggunakan primer ITS L dan ITS 4. Pemotongan menggunakan enzim *Bsp1431* menghasilkan dua fragmen spesifik yaitu 550bp dan 120bp. Enzim *BsuR1* memiliki situs pemotongan yang spesifik pada ukuran 600bp. Enzim *Eco471* memiliki situs pemotongan spesifik pada ukuran 450bp. Analisis dendrogram

menunjukkan bahwa aksesori durian nomor 12, 15, dan 17 memiliki kekerabatan yang dekat, diduga ketiganya merupakan sekerabat (satu spesies).

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2007. Illustra nucleon phytopure genomic DNA ekstraktion kits product booklet. Buckinghamshire. Online at <http://www.gelifesciences.com> [diakses tanggal 3 Desember 2012]
- Anuradha HJ, Vijayan K, Nair CV & Manjula A. 2013. A novel and efficient protocol for the isolation of genomic dna from Mulberry (*Morus L.*). *Emirates Journal Food Agriculture* 25 (2): 124-131
- Aris M. 2011. Identifikasi, patogenisitas bakteri dan pemanfaatan gen 16s-rrna untuk deteksi penyakit *ice-ice* pada budidaya rumput laut (*Kappaphycus alvarezii*). *Disertasi*. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, & Donoghue MJ. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal dna: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Baum DA, Small RL & Wendel JF. 1998. Biogeography and floral evolution of Baobabs (*Adansonia*, Bombacaceae) as inferred from multiple data sets. *Systematic Biology* 47(2): 181-207.
- Dharma B, Sudarmonowati E, Rahman M & Abbas ND. 2005. Metode baru dalam isolasi dna durian dan kerabatnya (*Durio spp.*) dalam analisis RAPD dengan modifikasi terhadap prosedur CTAB. Dalam: *Prosiding Seminar Nasional dan Kongres Biologi XIII*. Perhimpunan Biologi Indonesia Cabang Yogyakarta dan Panitia Lustrum X Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada. Yogyakarta, 16-17 September 2005. Hlm 56-60.
- Dixit A. 1998. A Simple and rapid procedure for isolation of *amaranthus* dna suitable for fingerprint analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* (16):1-8
- Doyle JJ & Doyle JL. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.
- Ekasari TWD. 2011. Analisis keanekaragaman genetika kultivar pisang menggunakan penanda PCR-RFLP pada *Internal Transcribed Spacer* (ITS) DNA ribosomal. *Skripsi*. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Grunenwald H. 2003. Optimization of polymerase chain reactions. Di dalam: *Methods in Molecular Biology: PCR Protocol*. JMS Bartlett and D Stirling

- (Eds). second edition. Totowa: Humana press. 89-99.
- Guzow-Krzeminska B, Gorniak M, & Wegrzyn G. 2001. Molecular determination keys : construction of keys for species identification based on restriction fragment length polymorphism. *Inter Arch Biosci* 1:1057-1067.
- Hameed A, Malik SA, Iqbal N, Arshad R & Farooq S. 2004. A rapid (100 min) method for isolating high yield and quality dna from leaves, roots and coleoptile of wheat (*triticum aestivum* l.) suitable for apoptotic and other molecular studies. *International Journal of Agriculture & Biology* 6(2):383-387
- Kawata M, Matsumura Y, Oikawa T, Kimizu M, Fukumoto F & Kuroda S. 2003. Analysis of DNA extraction buffer components from plant tissue by polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 318:314-317.
- Michiels A, den Ende WV, Tucker M, Riet LV & Laere AV. 2003. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry* 315:85-89.
- Moyo M, Amoo SO, Bairu MW, Finnie JF, & Staden JV. 2008. Optimising DNA isolation for medicinal plants. *South African Journal of Botany* 74:771-775.
- Novayandi A. 2004. Analisis keanekaragaman durian lokal serang berdasarkan penanda morfologi, isozim, dan gabungan morfologi-isozim. *Tesis*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Orozco-Castillo C, Chalmers KJ, Waugh R, Powell W. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 87:934-940
- Pandin DS. 2010. Penanda DNA untuk pemuliaan tanaman kelapa (*Cocos nucifera* L). *Perspektif* 9(1): 21-35
- Pettigrew JD, Karen LB, Adhil B, Eunice G, Ngalla J, Jean M, Emily W & Claudia EV. 2012. Morphology, ploidy and molecular phylogenetics reveal a new diploid species from Africa in the baobab genus *Adansonia* (Malvaceae: Bombacoideae). *Taxon* 61 (6): 1240-1250
- Rath P, Rajaseger G, Gooh CJ & Kumar PP. 1998. Phylogenetic analysis of Dipterocarps using random amplified polymorphic DNA markers. *Annals of Botany* 82:61-65
- Roux KH. 2009. *Optimization and troubleshooting in PCR*. Cold Spring Harbour Laboratory Press 4(4): 1-6
- Small RL, Cronn RC & Wendel JF. 2004. The use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Australian Systematic Botany*. 17:145-170
- Suman PSK, Ajit KS, Darokar MP & Sushil K. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 1-7
- Sobir, Guntoro D, & Septimayani I. 2005. Analisis keragaman genetik enam belas aksesi blewah (*Cucumis melo* l.) dengan metode random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Gakuryoku* 11(2): 177-180
- Somsri S. 2007. *Thai Durian*. Bangkok: Horticulture Research Institute, Department of Agriculture Chatuchak
- Vekemas X, Oliver H, Bruno B, Bourlaye F & Jean-pierre B. 1997. Use of PCR-RFLP on chloroplast DNA to investigate phylogenetic relationships in the genus *Phaseolus*. *Biotechnol, Agron. Soc, Environ*. 2 : 128-134.
- Vicente MC, Guzman FA, Engels J & Rao VR. 2005. Genetic Characterization and its use in Decision Making for the Conservation of Crop Germplasm. *The Role Biotechnology* 121-128.